



TITLE:

Immunocytochemical analysis of subcellular localization of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in plants( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Zhou, Ye

---

CITATION:

Zhou, Ye. Immunocytochemical analysis of subcellular localization of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in plants. 京都大学, 2019, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21817>

RIGHT:

( 続紙 1 )

京都大学	博士（農学）	氏名	周晔
論文題目	Immunocytochemical analysis of subcellular localization of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in plants (植物のペクチン質多糖ラムノガラクトンIIの細胞内局在に関する免疫組織化学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>ペクチンは植物一次細胞壁を構成する多糖で、ガラクトン酸が<math>\alpha</math>-1,4結合した主鎖に様々な側鎖が分岐する酸性多糖である。細胞壁中では親水性ゲルとして存在し、細胞壁の機械的強度の維持、細胞壁の水分保持、細胞壁のpH緩衝、細胞間接着などの重要な機能を果たしている。ペクチンをゲル化させる因子はホモガラクトン領域でのカルシウムによる架橋と、ラムノガラクトンII (RG II) 領域でのハウ酸によるジエステル結合である。RG IIはペクチンを構成する領域の一つで、12~15残基のガラクトン酸主鎖に、多くの希少糖を含む4本の側鎖が結合する複雑な構造をとっている。その希少糖の一つ、アピオースがハウ酸とハウ酸ジエステル結合を形成する。すなわち2本のペクチン鎖の2分子のアピオースに1分子のハウ酸が結合して2本のペクチン鎖が架橋される。この架橋こそが細胞壁の健全性に寄与している。それゆえに植物の器官や細胞壁内でのRG II局在部位や存在量、細胞の発達段階でのRG IIの分布と量の変化を知ることは植物のホウ素栄養を明らかにする上で重要な情報となる。</p> <p>細胞壁研究においても抗体を用いる免疫顕微鏡観察は重要なツールとなっているが、一般に多糖類の抗体作製では、免疫動物であるマウス、ラットやウサギが食植動物であるため多糖の抗原活性が低く抗体が産生されにくい。そこで本研究では酸性多糖であるRG IIと塩基性タンパク質であるメチル化牛血清アルブミンを混合してウサギを免疫したところ、使用に耐える抗体価をもつポリクローナル抗体を作製することができた。そこでこのウサギの脾臓を摘出し抗体生産細胞をハイブリドーマとしてモノクローナル抗体を産生するクローンの選抜を行い、抗体価の高いクローンを得て組換え抗体化し、ポリクローナル抗体の1000倍（イムノグロブリン濃度あたり）の抗体活性を持つモノクローナル抗体を得た。こうして調製したモノクローナル抗体はRG IIの主鎖であるポリガラクトン酸を認識しないこと、RG IIハウ酸複合体とRG II単量体のいずれも認識すること、から、RG IIのいずれかの側鎖を認識していると推定した。</p> <p>これらのポリクローナル抗体、モノクローナル抗体を調製する過程で、RG IIの固相表面固定化法を確立した。Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)では抗原をポリスチレン96穴プレートに固定化する必要があるが、親水性多糖断片であるRG IIは、疎水性相互作用によるプレートへの固定が困難であった。そこでアミノ基で表面修飾されたプレートを用い、RG II主鎖のガラクトン酸カルボキシル基とペプチド結合を形成させて固定する方法を確立した。これによりRG IIのELISAが可能になった。</p> <p>ついでタバコ培養細胞におけるRG IIの局在部位を知るため、ウサギポリクローナル抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。RG IIは細胞壁に一樣に検出されたが、細胞内にも反応する細胞内小器官が見出され、形態的な観察から細胞板と考えられた。細胞板は細胞が分裂して二つの娘細胞が形成される時に仕切り板となり、その後、細胞壁に分化する。細胞板にペクチン質多糖が存在することは知られているが、その構成は知られていなかった。そこで細胞板に局在することが明らかにされているカロースとの共局在を検討したところ、RG II抗体が反応する細胞内小器官はカロース抗体によっても染色された。また微小管の構成成分であるチューブリンに対する抗体を用い、この細胞内小器官が微小管に近接して存在することを示した。微小管は細胞分裂時に細胞板周辺に凝集する。これらの結果から、この細胞内の標識部位は形成中の細胞板（フラグモプラスト）であると確認した。この結果はRG IIが細胞壁形成の極めて早い時期</p>			

からペクチン質多糖の架橋に機能していることを示している。

さらにモノクローナル抗体を用いてシロイヌナズナ根端組織の免疫電子顕微鏡観察を行った。RG IIは細胞壁に多く検出されたが、根伸長方向に対して細胞横断面よりも縦断面に多く検出された。この結果は一つの細胞の細胞壁でRG IIが不均一に分布することを示している。分裂中の細胞では細胞板にもRG IIが検出された。その標識は、成熟領域に相当する中心部だけでなく形成途上の周縁部に存在する小胞にも認められた。これらの検討を通じてRG IIが細胞壁形成の極めて初期の段階から細胞壁に存在することが明らかになり、ホウ素が植物の必須元素として細胞壁の完全性の獲得に機能していることが示された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

ペクチンは植物一次細胞壁を構成し、細胞壁の機械的強度の維持、水分保持、pH 緩衝、細胞間接着などの重要な機能を果たしている。カルシウムとハウ素はペクチン質多糖を架橋する機能を持ち、それゆえに植物にとっての必須栄養元素として機能している。ハウ素は細胞壁からラムノガラクトン II (RG II) との複合体として単離され、細胞壁の RG II 含有率とハウ素含有率に正の関係を持つことが明らかにされている。そこで申請者は植物の栄養元素としてのハウ素の機能、局在部位を明らかにするため、ウサギを RG II で免疫し RG II の抗体を作製し検討を進めた。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 植物細胞壁から単離精製された RG II をメチル化牛血清アルブミンとの混合物としてウサギに免疫し、使用に耐える抗体価を持つ RG II ポリクローナル抗体を作製した。
2. ポリクローナル抗体を産生するウサギの脾臓細胞からハイブリドーマを作製し、ポリクローナル抗体の 1000 倍 (イムノグロブリン濃度あたり) の抗体価を持つ RG II モノクローナル抗体を作製した。ついで、このモノクローナル抗体の特異性を検討して RG II 以外のペクチン質多糖を認識しないことを示し、さらに認識部位 (エピトープ) が RG II の 4 つの側鎖のいずれかであることを推定した。
3. これらの抗体を用いて任意の試料中の RG II を ELISA によって定量する方法を確立した。
4. モノクローナル抗体を用いて、シロイヌナズナの伸長中の根において RG II が細胞の横断方向よりも伸長方向により多く存在することを示した。
5. ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体を用いて、分裂中のタバコ培養細胞と活発に伸長しているシロイヌナズナ根細胞のいずれにおいても、細胞板 (フラグモプラスト) が RG II 抗体で標識されることを示し、RG II 領域を含むペクチン質多糖が細胞壁の生成初期から細胞壁に分泌されること、ペクチン質多糖が細胞壁形成の初期過程で重要な機能を果たしていることを示した。

以上のように、本論文は植物栄養学、植物細胞構造学、植物生理学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 31 年 2 月 8 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から 3 ヶ月以内)